

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07303481 A**

(43) Date of publication of application: **21 . 11 . 95**

(51) Int. Cl.

**C12N 3/00**  
**A01N 63/00**  
**C12N 1/14**  
**//(C12N 1/14 , C12R 1:645 )**

(21) Application number: **06124217**

(71) Applicant: **JAPAN TOBACCO INC**

(22) Date of filing: **13 . 05 . 94**

(72) Inventor: **SAWAJI SEISHI**  
**HONDA MINORU**

(54) **CHLAMYDOSPORE, HERBICIDE CONTAINING  
THE SAME AND INDUCING MEDIUM THEREFOR**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a cell new of a microorganism, having the pathogenicity against weeds in paddy fields such as Eleo charis kuroguwai Ohwi, nontoxic to crops such as rice plant, having a short latent period and culturable in a liquid, a herbicide containing the same as an active ingredient and a preparing means thereof.

CONSTITUTION: This chlamydospore is that of Nimbya

scirpicola K-004 (FERM BP-4448) and this herbicide contains the same as an active ingredient. Further, this inducing medium for the Nimbiya scirpicola K-004 contains 0.1-10% carbon source, 0.05-5% sodium nitrate as a nitrogen source, 0.05-5.0% yeast extract and 0.01-1.0% potassium phosphate, 0.001-0.1% magnesium sulfate, 0.01-1.0% calcium carbonate, 0.0001-0.01% zinc chloride and 0.00005-0.005% iron chloride as inorganic salts.

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-303481

(43) 公開日 平成7年(1995)11月21日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 3/00		8828-4B		
A 0 1 N 63/00	F			
C 1 2 N 1/14	A	8828-4B		
// (C 1 2 N 1/14				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平6-124217

(22) 出願日 平成6年(1994)5月13日

(71) 出願人 000004569

日本たばこ産業株式会社  
東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

(72) 発明者 澤路 聖之

神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 植物  
開発研究所横浜センター内

(72) 発明者 本田 実

神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 植物  
開発研究所横浜センター内

(74) 代理人 弁理士 谷川 英次郎

(54) 【発明の名称】 厚膜胞子、それを含有する除草剤及びその誘導培地

(57) 【要約】

【目的】 クログワイ等の水田雑草に対して病原性を有し、イネ等の作物に対しては無害で、感染後、病徴発現までの潜伏期間が短く、液体培養が可能な新規な微生物細胞、それを有効成分として含有する除草剤及びその調製手段を提供すること。

【構成】 ニンビヤ スシルピコラK-004 (FERM BP-4448) の厚膜胞子及びこれを有効成分として含有する除草剤を提供した。さらに、炭素源を0.1%から10%、窒素源として硝酸ナトリウムを0.05%から5%、イーストエキストラクトを0.05%から5.0%、無機塩として磷酸カリウムを0.01%から1.0%、硫酸マグネシウムを0.001%から0.1%、炭酸カルシウムを0.01%から1.0%、塩化亜鉛を0.0001%から0.01%、塩化鉄を0.00005%から0.005%含む、ニンビヤ スシルピコラK-004の厚膜胞子の誘導培地を提供した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ニンビヤ スシルピコラK-004 (FERM BP-4448) の厚膜孢子。

【請求項2】 請求項1記載の厚膜孢子を有効成分として含有する除草剤。

【請求項3】 炭素源を0.1%から10%、窒素源として硝酸ナトリウムを0.05%から5%、イーストエキストラクトを0.05%から5.0%、無機塩として磷酸カリウムを0.01%から1.0%、硫酸マグネシウムを0.001%から0.1%、炭酸カルシウムを0.01%から1.0%、塩化亜鉛を0.0001%から0.01%、塩化鉄を0.00005%から0.005%含む、請求項1の厚膜孢子の誘導培地。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ニンビヤ スシルピコラ (*Nimbya scirpicola*) K-004の厚膜孢子、それを有効成分として含有する除草剤及びそれを誘導するための培地に関する。

## 【0002】

【従来の技術】微生物の厚膜孢子を用いて雑草を防除する方法として、疫病菌 (*Phytophthora palmivora*) を用いたStrangler vineの防除方法が知られている。しかしながら、この方法では水田の雑草に対して効力がない。

【0003】水田での雑草を微生物を用いて防除する方法、特に、多年生の難防除雑草として知られるクログワイに対する防除方法として、ハイホミセテスの新属菌を用いる防除方法に関する発明が知られている (特公平5-59084号公報)。しかしながら、このハイホミセテス新属菌の病徴発現までの潜伏期間が約2週間と長く、即効性に問題がある。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、クログワイ等の水田雑草に対して病原性を有し、イネ等の作物に対しては無害で、感染後、病徴発現までの潜伏期間が短く、かつ工業的生産の観点から液体培養が可能な新規な微生物細胞、それを有効成分として含有する除草剤及びその調製手段を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、先にニンビヤ スシルピコラ (*Nimbya scirpicola*) の新規菌株であるニンビヤ スシルピコラK-004 (FERM BP-4448) (以下、単にK-004ということがある) が、クログワイに対して除草効果を有し、かつ、イネ、コムギ、インゲン、ナス、トマト等の作物には感染せず、目標雑草に対する選択的な防除が可能であることを見出した (特開平5-30964号)。一般に、微生物を除草剤の有効成分として用いる場合、耐久性に優れた孢子を用いることが有利である。しかしながら、K-004の孢子は、寒天培地上で培養した場合にしか生

成せず、液体培地中で孢子を形成させることはできない。従って、K-004の孢子は除草剤として有効であるが、工業的な生産の点で問題がある。

【0006】本願発明者らは、鋭意研究の結果、特定の培地でK-004を培養すると、固体培地上に見られる通常の孢子とは異なる厚膜孢子が形成されることを見出し、しかも、この厚膜孢子は液体培地で大量に生産することが可能であり、かつ、この厚膜孢子を除草剤として用いても通常の孢子を用いた場合と同程度の雑草防除効果が得られることを見出し本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、ニンビヤ スシルピコラK-004 (FERM BP-4448) の厚膜孢子を提供する。また、本発明は、該K-004の厚膜孢子を有効成分として含有する除草剤を提供する。さらに本発明は、炭素源を0.1%から10%、窒素源として硝酸ナトリウムを0.05%から5%、イーストエキストラクトを0.05%から5.0%、無機塩として磷酸カリウムを0.01%から1.0%、硫酸マグネシウムを0.001%から0.1%、炭酸カルシウムを0.01%から1.0%、塩化亜鉛を0.0001%から0.01%、塩化鉄を0.00005%から0.005%含む、K-004の厚膜孢子の誘導培地を提供する。

【0008】特開平5-30964号に記載した通り、K-004は日本各地より罹病したクログワイを収集し、クログワイに対し病原性を有する菌株を分離して、純粋培養し、クログワイに対する防除効果を検討すると共に他の作物、特にイネに対する非感染性を検討するスクリーニング手段によって創製したものである。K-004の菌学的性質の主なものは次のとおりである。好気性菌であり、生育可能なpH範囲は5~8、生育温度は16~33℃、生育適温は18~28℃の範囲である。V8ジュース (商品名、Campbell Soup Company 製、以下同じ) 寒天培地 (以下、「V8寒天培地」と略記する) 上において、集落の表面は黒色であり、いわずま状に拡大する。孢子は白色ないし暗褐色であり、長さ約300μm、幅約15μmの長円筒状であり、隔壁の明確なものと不明確なものがある。隔壁を有するものは、通常7~10個の細胞から成る。菌糸は2種類あり、1種類は孢子が発芽、伸長したもので、約20μmごとに隔壁を持ち、もう1種類は白色の長い菌糸である。V8寒天培地上で生育良好であるが、プレート全面に集落が拡大するのに約1か月を要する。移植当初、多数の孢子が形成されるが、次第に白い菌糸が集落上を覆うようになり、約2週間経過後、これらの菌糸は増殖を停止し、コロニー表面は再び黒色を呈するようになる。また、K-004のオートミル寒天培地 (以下、「OMA培地」と略記する) 及びジャガイモ寒天培地 (以下、「PDA培地」と略記する) におけるコロニーの形状と色調は次のとおりである。OMA培地上におけるコロニーの形状は、V8寒天培地上と異なり、いわずま状を呈さない。

表面から観察すると、同心円状に生育していくが、コロニーの周縁は完全な同心円とはならない。コロニーの色調は、暗緑色ないし黒色である。気中菌糸が形成されることがあるが、白色である。裏面から観察したコロニーの形状、色調とも表面から観察したものと同じである。PDA培地上においても同心円状にコロニーは拡大する。表面から観察すると、コロニーは完全な同心円ではない。周縁部は不規則に波打っている。コロニーの色調は黒色を呈するが気中菌糸は白色である。裏面から観察しても、形状及び色調は、表面から観察したものと同様である。これらの菌学的性質に基づき、*Macrospora Fuc* kel (Pleoporales) and related anamorphs (E. G. Simmons 著、Sydowia 発行、1989年)の記載を参照してこの微生物はニンビヤ スシルピコラと同定された。

【0009】厚膜胞子とは、菌学上、細胞壁の厚い、非脱落性 (non-diciduous) の細胞で、栄養細胞の部間又は末端が球状化して形成される無性的胞子とされているが、栄養細胞の一変形体と見る見方もある。

【0010】K-004の厚膜胞子の形態的特徴は次のとおりである。

- (1) 色：無色ないし褐色
- (2) 長さ：50  $\mu$ mから200  $\mu$ m
- (3) 幅：10～15  $\mu$ m
- (4) ほぼ球形の細胞が1から20個単独で、又は鎖状若しくはクラスター状に連結
- (5) 全体として長円筒状
- (6) 各細胞間の細胞壁が明確
- (7) 細胞壁が栄養細胞より厚い

【0011】K-004の厚膜胞子は、特定の組成を有する液体培地中でK-004を培養することにより大量に生産することができる。この液体培地は、炭素源を0.1%から10%、好ましくは0.5%から5%、窒素源として硝酸ナトリウムを0.05%から5%、好ましくは0.5%から5%、イーストエキストラクトを0.05%から5.0%、好ましくは0.5%から5%、無機塩として磷酸カリウムを0.01%から1.0%、好ましくは0.05%から0.5%、硫酸マグネシウムを0.001%から0.1%、好ましくは0.005%から0.05%、炭酸カルシウムを0.01%から1.0%、好ましくは0.05%から0.5%、塩化亜鉛を0.0001%から0.01%、好ましくは0.0005%から0.005%、塩化鉄を0.00005%から0.005%、好ましくは0.0001%から0.001%含む。炭素源としては、微生物の培地に炭素源として用いられているものであればいずれのものをも用いることができるが、好ましい例としてポテトスターチ、ショ糖、ブドウ糖、デキストリン、モラセス等を挙げることができる。

【0012】培養は、好氣的条件下、好ましくは振盪条\*

\* 条件下で、上記培地中で、16℃から33℃、好ましくは18℃から28℃の温度下で行うことができる。下記実施例において具体的に記載されるように、上記培地を用いてK-004を培養することにより、培養液1mL当たり150万個もの厚膜胞子が生産される。

【0013】このように、本発明のK-004の厚膜胞子は、液体培地中で培養することにより生産することができるので、大量生産が可能であり、産業上、極めて有利である。

10 【0014】後述する実施例において具体的に記載するように、本発明のK-004の厚膜胞子は、クログワイやタマガヤツリのような水田雑草に対し、通常の胞子と同様な雑草防除効果を発揮する。従って、本発明のK-004の厚膜胞子は除草剤の有効成分として利用することができ、本発明は、該厚膜胞子を有効成分とする除草剤を提供した。

20 【0015】本発明の除草剤は、上記有効成分のみから成っていてもよいが、農薬として用いられる担体と共に製剤したものが好ましく用いられる。例えば、K-004の厚膜胞子を水、pH緩衝液又はポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステル (商品名：Tween) のような界面活性剤を含む水に懸濁したものを好ましく用いることができる。この場合、厚膜胞子の濃度は1mL中、 $10^3$  個以上が好ましく、 $10^5$  以上がさらに好ましい。また、厚膜胞子を含む上記培養液自体又はこれを水若しくはpH緩衝液で希釈したものも除草剤として用いることができる。

30 【0016】本発明の除草剤は、クログワイやタマガヤツリ等の水田雑草に対して雑草防除効果を有する。除草剤の散布時期はいずれの時期であっても効果を発揮する。また、散布量は、雑草の生育数や生育時期により異なるが、通常、水田1m<sup>2</sup> あたり、厚膜胞子数で $10^7$  個ないし $10^8$  個程度が好ましい。

【0017】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0018】**実施例1** K-004の厚膜胞子の生産  
下記表1に示す組成を有する液体培地にK-004を接種し、200mL容三角フラスコを用い、25℃で液体振盪培養した。培養を開始して7日目に、顕微鏡を用いて液体培養中の菌体形態を観察した。また、対照として、糸状菌用の液体培地として一般に用いられているツアペック・ドックス培地、リチャード培地、ポテト・デキストロース培地、オートミル培地、V8培地による液体培養を試みた。

【0019】

【表1】

表1

成分	濃度 (g/L)
ポテトスターチ	40
硝酸ナトリウム	9
磷酸カリウム	2
硫酸マグネシウム	0.2
炭酸カルシウム	2
塩化亜鉛	0.01
塩化鉄	0.005
イーストエキストラクト	9

【0020】その結果、糸状菌用液体培地として一般に用いられているツアベック・ドックス培地ではK-004はほとんど生育せず、本糸状菌の培養には不適であった。リチャード培地、ポテト・デキストロース培地、オートミール培地、V8培地では、栄養菌糸体の生育は認められたものの厚膜胞子の形成には至らなかった。本発明の液体培地を用いた液体培養では、K-004の厚膜胞子が多量に形成された。

【0021】また、上記液体培養において、培養を開始して7日目に培養液1mLあたりの厚膜胞子の数を計測した。その結果、ツアベック・ドックス培地、リチャード培地、ポテト・デキストロース培地、オートミール培地及びV8培地のいずれを用いた培養でも、厚膜胞子の数は0であり、本発明の培地を用いた場合には150万\*

\* 個/mLの厚膜胞子が形成された。

【0022】実施例2 K-004の厚膜胞子の防除効果

実施例1と同様の液体振盪培養法により得られたK-004の厚膜胞子を屋外で生育中のクログワイに噴霧接種した。接種の条件は、 $10^6$  個/mLの厚膜胞子を1ポットあたり1mL接種した。接種して30日後にクログワイの病徴観察を行ない、発病率、発病指数、防除効果を調査した。また、対照として平板培養法で得られたK-004の胞子を同様に噴霧接種して、発病率等を同様に調査した。結果を下記表2に示す。

【0023】

【表2】

表2

	発病率 (%)	発病指数	防除効果
厚膜胞子	56	2.1	2.7
胞子	56	2.1	2.7

【0024】表2から明らかなように、K-004の厚膜胞子を用いると、胞子と同等の発病率、発病指数及び防除効果が得られることがわかる。なお、表2に示す、「発病指数」とは無病徴を0、クログワイ茎葉長に対する病斑長の割合が25%未満を1、25%以上50%未満を2、50%以上75%未満を3、75%以上100%未満を4、茎葉全体が完全枯死した場合を5とした1ポット中の接種した茎葉の平均値を意味し、「防除効果」とは、健全を0、完全枯死を5とした場合の達観による効果の判定を意味する。

【0025】

※

※【発明の効果】本発明により、クログワイ等の水田雑草に対して防除効果を有する、K-004の新規な厚膜胞子、これを有効成分として含有する除草剤及び該厚膜胞子を誘導する培地が提供された。本発明の厚膜胞子は、K-004の胞子や菌糸体と同様、クログワイやタマガヤツリ等の水田雑草に対して強力な防除効果を発揮する一方、イネ、コムギ、インゲン、ナス、トマト、ヒエに病原性を示さない。さらに、本発明のK-004の厚膜胞子は液体培地により生産することができるので、大量生産が可能であり、工業的生産に有利である。